

Observatorio microbiológico de cuevas: evaluación y control de comunidades fúngicas en cuevas sometidas al impacto de actividades turísticas

B. Hermosín⁽¹⁾, A. Nováková⁽²⁾, V. Jurado⁽¹⁾, L. Láiz⁽¹⁾, E. Porca⁽¹⁾, M. A. Rogelio⁽¹⁾,
S. Sánchez-Moral⁽³⁾ y C. Sáiz-Jiménez⁽¹⁾

(1) Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología, Consejo Superior de Investigaciones Científicas, Avenida Reina Mercedes 10. 41012 Sevilla.

hermosin@irnase.csic.es

(2) Instituto de Biología del Suelo, Na Sádkách 7, CZ-370 05 eské Bud jovice, Chequia.

alena@upb.cas.cz

(3) Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC. 28006 Madrid.

ssmilk@mncn.csic.es

RESUMEN

En la última década se está asistiendo a una progresiva colonización de cuevas visitables por microorganismos. Así, las cuevas de Lascaux, Montignac, Francia, y de Castañar de Ibor, Cáceres, sufrieron brotes de *Fusarium solani*, hongo que ha sido encontrado también en la cueva de Doña Trinidad, Ardales, Málaga. En este trabajo se plantean las bases para la creación de un Observatorio Microbiológico de Cuevas, desde donde se pueda controlar los hongos presentes en el ecosistema, y detectar a tiempo aquellos brotes que pudieran comprometer la integridad de la cueva y sus pinturas rupestres, en el caso que las tuviera. Al mismo tiempo, se pretende estudiar las relaciones entre la comunidad fúngica y los habitantes de las cuevas (insectos, roedores, etc.), ya que muchos de los hongos presentes son parásitos de otros organismos y los utilizan para su entrada y dispersión en la cueva. Para el desarrollo de este estudio es fundamental el control del aire de la cueva, así como la utilización de técnicas moleculares como la amplificación de secuencias de los genes de ARN ribosómico 18S e ITS con el fin de identificar los miembros de las comunidades fúngicas. La distribución espacial y temporal de los componentes de la comunidad fúngica se llevará a cabo mediante muestreos en distintas estaciones del año en las diferentes salas de las cuevas. Al mismo tiempo se determinará la presencia de hongos metabólicamente activos en distintos nichos. El conocimiento de los procesos de dispersión de esporas y su modelización teniendo en cuenta las corrientes de aire y los gradientes de temperatura, la eventual colonización de distintos materiales por comunidades microbianas, las características tróficas de estas comunidades y las relaciones entre los distintos habitantes de la cueva deben permitir el diseño de una estrategia de control que garantice su conservación.

Palabras clave: cadena trófica, colémbolos, cuevas, hongos, roedores

Caves microbial observatory: assessment and control of fungal communities in show caves

ABSTRACT

*The last decade has seen a progressive colonisation of visitable caves by microorganisms. The caves of Lascaux, Montignac, France, and of Castañar de Ibor, Cáceres, have suffered outbreaks of *Fusarium solani*, a fungus that has*

B. Hermosín, et al., 2010. Observatorio microbiológico de cuevas: evaluación y control de comunidades fúngicas en cuevas sometidas al impacto de actividades turísticas

also been found in Doña Trinidad Cave, Ardales, Málaga. This work sets out the bases for the creation of a Cave Microbiological Observatory for controlling the fungi present in the ecosystem and the timely detection of outbreaks that could compromise the integrity of the cave and any cave paintings present. At the same time, it is intended to study the relationships between the fungal community and cave inhabitants (insects, rodents, etc.), as many of the fungi present are parasites, and use the inhabitants to enter the cave and disperse in it. The execution of this study entails monitoring the air of the cave, and the use of molecular techniques such as the amplification of gene sequences of 18S and ITS ribosomal RNA to identify the members of the fungal communities. The spatial and temporal distribution of the components of the fungal community will be examined by samplings in different seasons of the year in the various halls of the caves. The presence of metabolically active fungi in various niches of the caves will be tested. Knowing the processes of spore dispersion and modelling it taking into account air currents and temperature gradients, the eventual colonisation of different materials by microbial communities, the trophic nature of the latter, and the relationships between the different inhabitants of the cave, should enable the design of a control strategy to guarantee its conservation.

Key words: caves, colembola, food chain, fungi, rodents

Introducción

Andalucía es, junto a Cantabria, la región española que cuenta en la actualidad con un mayor número de cavidades kársticas abiertas al turismo (Fernández-Cortés *et al.*, 2008). El impacto del turismo de masas ha originado que cuevas como Altamira y Lascaux hayan sido cerradas al público, y este desviado a réplicas. En la última década, y desde la colonización masiva de la cueva de Lascaux, Francia, en el año 2001 por *Fusarium solani*, tanto en la comunidad científica como en la sociedad, se ha incrementado el interés por conocer las causas de la colonización de cuevas por hongos y los métodos para combatirla (Elliot, 2006; Dupont *et al.*, 2007; Geneste, 2008; Sire, 2008).

Muy recientemente se han podido conocer las causas y los efectos de la contaminación de la cueva de Lascaux, gracias a la colaboración del Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla y el Institut National de la Recherche Agronomique de Dijon (Bastian *et al.*, 2009 a-c, 2010). Asimismo, nuestro grupo de investigación ha confirmado la presencia de hongos en Altamira (Jurado *et al.*, 2009) y determinado los mecanismos de introducción de tales hongos en la cueva. En general, parece ser que aparte de la dispersión de esporas procedentes del exterior, que penetran mediante las corrientes de aire, dos factores fundamentales son la introducción de hongos entomófilos y/o entomopatógenos, asociados a los insectos que penetran desde el exterior, y la presencia de roedores, cuyos excrementos favorecen el crecimiento de hongos y la dispersión en la cueva de conidios (Jurado *et al.*, 2008, 2009).

El incremento del número de conidios de hongos en el aire de una cueva representa un peligro por la capacidad de estos de colonizar cualquier tipo de materia orgánica introducida por las visitas. Por otra parte, el aumento de materia orgánica disponible que supone la presencia de roedores, y la colonización de sus excrementos por hongos, que alimentan a la población de colémbolos y otros insectos, contribuyen igualmente a la dispersión de los hongos (Nováková, 2009) y a la colonización de otros materiales, tanto orgánicos como inorgánicos que puedan ser introducidos en la cueva (Jurado *et al.*, 2009; Bastian *et al.*, 2010).

La National Science Foundation americana lanzó en 2004 el programa "Microbial

Observatories” para apoyar la investigación encaminada a descubrir y caracterizar nuevos microorganismos, consorcios y comunidades microbianas, y estudiar su papel en diversos ecosistemas. Este programa proporciona los medios para aumentar substancialmente el censo microbiano y acelerar el descubrimiento de nuevas especies microbianas. Uno de los Observatorios Microbianos propuestos en el año 2006 fue el de cuevas. Nuestro grupo, de hecho, viene actuando como tal observatorio desde hace 15 años, compartiendo esos mismos objetivos, en lo que respecta a cuevas como la de Altamira. Con el proyecto que presentamos, financiado por la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa en la convocatoria 2009, y que comenzó el 3 de febrero de 2010, se pretende extender el observatorio a los hongos, seleccionando tres cuevas andaluzas que soportan distintas cargas de visitantes (Gruta de las Maravillas, Cueva del Tesoro y Cueva de Doña Trinidad). Una vez establecidas las bases de la investigación y definidos los parámetros a evaluar en estas tres cuevas, el sistema se podría aplicar al resto de cuevas de la Comunidad Andaluza.

En una investigación preliminar se detectó la presencia de *Fusarium solani* en la Cueva de Doña Trinidad, lo que propició que esta fuera una de las elegidas para efectuar investigaciones más extensas y detalladas sobre los reservorios de hongos y las posibilidades de que se produzca un crecimiento explosivo de estos. Un brote de esta especie tuvo lugar en el año 2008 en la Cueva de Castañar de Ibor, Cáceres, donde se produjo una invasión masiva de *Fusarium solani* y *Mucor circinelloides*, debido a un vertido accidental de residuos orgánicos. Éste, en 40 horas, dio lugar a una colonización de sedimentos y paredes, que nuestro grupo está controlando con eficacia mediante limpieza mecánica y la utilización de peróxido de hidrógeno para oxidar la materia orgánica y eliminar las estructuras fúngicas no accesibles (Jurado *et al.*, 2010).

En el proyecto de Observatorio nos proponemos no sólo el estudio de la variedad de especies existentes en las comunidades fúngicas de las cuevas seleccionadas, sino también investigar su función y papel en los nichos donde se encuentran. Hasta ahora sólo existen conocimientos fragmentados sobre el tema, ya que muchos de los miembros de una comunidad microbiana son difíciles de cultivar, probablemente debido al desconocimiento de su metabolismo y papel en los ecosistemas naturales. Nuestro grupo, mediante la utilización de técnicas moleculares, pretende rellenar esa laguna y poner a punto los medios necesarios para poder estudiar los hongos activos en cuevas. Esto permitirá trabajar con independencia del cultivo, aunque todas las técnicas disponibles se utilizarán en paralelo.

La hipótesis de partida es que con los instrumentos de análisis que disponemos actualmente podemos determinar pautas de colonización de comunidades fúngicas en cuevas, de forma que se pueda predecir su evolución a lo largo del tiempo, cosa que hasta ahora no se ha hecho en el campo de la conservación de cuevas, y que representaría un importante avance.

El principal objetivo es conocer el riesgo potencial de la presencia de hongos en cuevas y proponer métodos efectivos para la evaluación, control y prevención de la colonización de cuevas sometidas a visitas turísticas. Los objetivos concretos que se pretenden conseguir se pueden resumir en:

- Determinar los reservorios de hongos en cuevas, incluyendo sedimentos y aire, así como los animales más activos (insectos y roedores).

- Determinar la estabilidad de las comunidades fúngicas y la variación temporal de sus componentes, a lo largo del año. Además los gradientes de temperaturas entre el interior y exterior producen corrientes de aire capaces de dispersar las esporas.
- Establecer pautas de control de las poblaciones fúngicas y evitar colonizaciones masivas.
- Establecimiento de un Observatorio Microbiológico de Cuevas Andaluzas.

Por ello, en esta investigación queremos profundizar en el conocimiento de las comunidades fúngicas que se desarrollan en cuevas, estudiando los componentes de las comunidades, su estructura y función, y contribuir al conocimiento de la biodiversidad y ecología de los hongos en cuevas. Asimismo, se efectuarán análisis de ARN, que serán de utilidad para decidir en qué especies sería interesante fijar la atención por estar activas en la cueva, e intentar relacionar sus estrategias colonizadoras con su actividad metabólica. El fin último es obtener información precisa que permita atajar invasiones masivas como las de Lascaux y Castañar de Ibor y proteger adecuadamente las cuevas andaluzas, muchas de ellas Bienes de Interés Cultural por sus manifestaciones rupestres, y otras Monumentos Naturales.

Resultados preliminares

En los últimos años la Cueva de Doña Trinidad, Ardales, Málaga, ha sido estudiada exhaustivamente en lo que respecta a microclimatología, geología e hidroquímica por dos equipos del Museo Nacional de Ciencias Naturales, CSIC, Madrid, y de la Universidad de Alicante, mediante un convenio con la Consejería de Cultura, de la Junta de Andalucía. Por ello se cuenta como punto de partida con las características ambientales de la cueva a lo largo de un mínimo de dos años, así como otros aspectos, valiosos a la hora de comprender la ecología microbiana en la cueva.

Por otra parte, en el seno del mismo convenio, en el Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología de Sevilla se dedicó atención a los problemas de colonización de rocas y espeleotemas por bacterias y a su identificación (Stomeo *et al.*, 2008). Los tres grupos, actuando coordinadamente, pretenden elaborar un modelo de flujo del aire en el interior de la cueva, que debe ser validado con los datos de aerobiología (microorganismos presentes en el aire).

La cueva muestra una marcada eutrofización como consecuencia de la presencia de murciélagos y roedores, observados en nuestras visitas a lo largo de los últimos años. El 3 de noviembre de 2008 se efectuó un muestreo preliminar para determinar los tipos y variedad de taxones fúngicos presentes en la cueva, lo que permitió conocer las características de los hongos y sus posibles reservorios. La tabla 1 muestra los hongos identificados, agrupados según la naturaleza del sustrato donde se encontraron. En la cueva destaca la presencia de hongos coprófilos o relacionados con excrementos de animales (*Aspergillus asperescens*, *Beauveria felina*, *Penicillium grandicola*, *Penicillium vulpinum* y *Rhizomucor pusillus*), así como también de algunos hongos entomopatógenos (*Chrysosporium merdarium*, *Engyodontium album*, y *Tolytocladium inflatum*). El resto son habitantes comunes en suelos y restos vegetales frescos o en descomposición. Además, unos pocos hongos han sido descritos como patógenos humanos comunes u ocasionales (*Aspergillus fumigatus*, *Engyodontium album*, *Fusarium solani*).

Como control se tomó una muestra del suelo exterior de la cueva, destacando las diferentes especies de hongos aisladas en el exterior e interior de la cueva.

Posteriormente, el 23 de marzo y el 29 de abril de 2010 se efectuaron muestreos tanto en el aire como en los sedimentos con el fin de identificar los hongos presentes en la cueva y sus posibles reservorios. Hay que destacar la elevada eutrofización (enriquecimiento en nutrien-

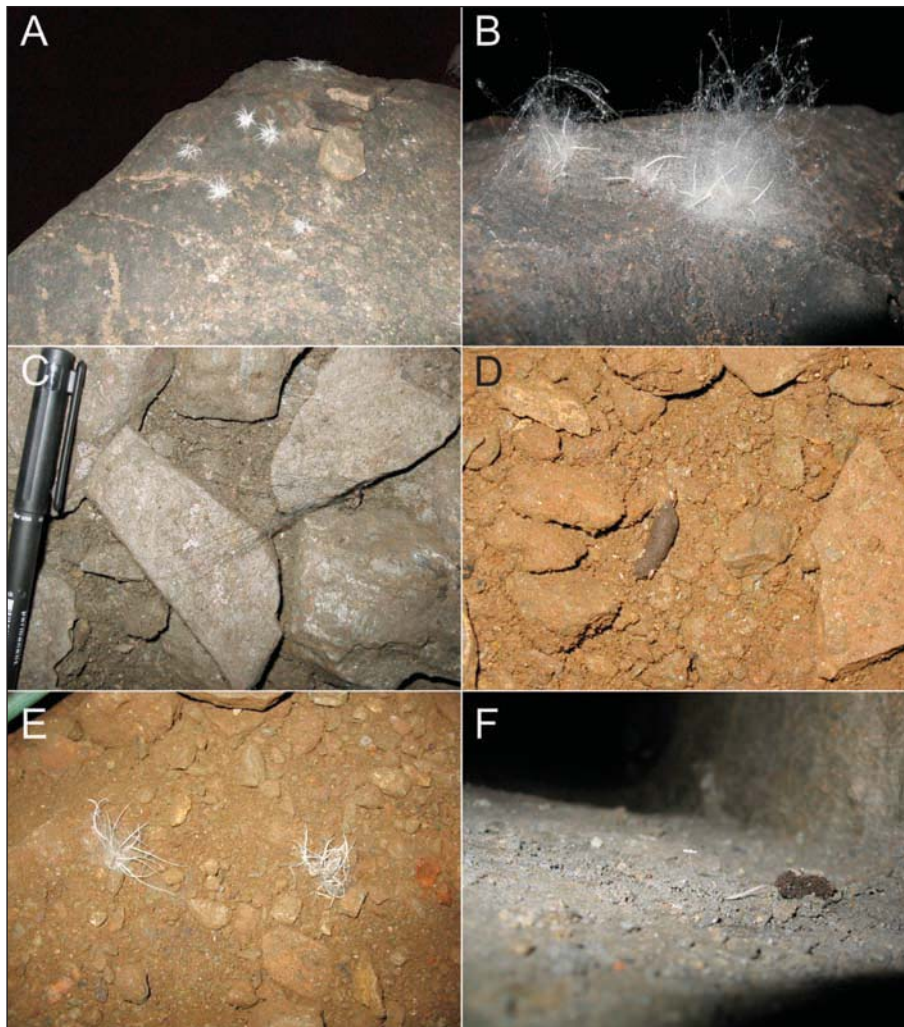


Figura 1. Cueva de Doña Trinidad, Ardales. A: En la cueva se encuentran abundantes excrementos de roedores colonizados por hongos. B: Detalle de la colonización de hongos, donde se observa la presencia de coremios blancos de *Beauveria felina* entre micelios de *Mucor* sp. C: Micelios de hongo sin identificar. D: Excremento reciente de roedor colonizado por insectos (colémbolos). E: Excrementos de roedor del que emergen grupos de conidióforos erectos (coremios) de *Beauveria felina*. F: *Basidiomiceto* (seta) creciendo a partir de un excremento de roedor.

B. Hermosín, et al., 2010. Observatorio microbiológico de cuevas: evaluación y control de comunidades fúngicas en cuevas sometidas al impacto de actividades turísticas

Hongos	1*	2	3	4	5	6	7	8	9
<i>Aspergillus asperescens</i>	+	+							E
<i>Aspergillus flavipes</i>									S
<i>Aspergillus fumigatus</i>		+				+			S, H
<i>Aspergillus ochraceus</i>		+							S
<i>Aspergillus oryzae</i> f. <i>effusus</i>		+	+						S
<i>Aspergillus ustus</i>		+						+	S
<i>Aspergillus versicolor</i>		+							S
<i>Beauveria felina</i>					+				E
<i>Botryotrichum piluliferum</i>	+	+							S
<i>Chaetomium globosum</i>		+							S
<i>Chrysosporium merdarium</i>		+							I
<i>Cladosporium cladosporioides</i>		+		+					S, P
<i>Cladosporium</i> cf. <i>sphaerospermum</i>	+			+					S, P
<i>Clonostachys rosea</i> f. <i>rosea</i>	+								S, P
<i>Engyodontium album</i>		+							I, H
<i>Fusarium lateritium</i>	+								I, P
<i>Fusarium solani</i>		+				+	+		S, P, H
<i>Fusarium</i> sp.		+							-
<i>Humicola grisea</i>									S
<i>Humicola</i> sp.		+				+			-
<i>Mucor circinelloides</i> f. <i>circinelloides</i>			+		+	+			S
<i>Mucor hiemalis</i> f. <i>silvaticus</i>					+				S
<i>Mucor racemosus</i> f. <i>racemosus</i>			+		+				S
<i>Mucor</i> sp.			+		+				-
<i>Mucor plumbeus</i>	+								S, A
<i>Penicillium</i> cf. <i>canescens</i>	+								S
<i>Penicillium expansum</i>					+				P
<i>Penicillium glabrum</i>					+				S
<i>Penicillium glandicola</i>						+			E
<i>Penicillium janczewskii</i>	+								S
<i>Penicillium minioluteum</i>		+	+						S
<i>Penicillium variabile</i>						+			S
<i>Penicillium vulpinum</i>			+		+		+		S
<i>Penicillium</i> sp. (subgenus <i>Penicillium</i> 1)	+	+	+						-
<i>Penicillium</i> sp. (subgenus <i>Penicillium</i> 2)						+			-
<i>Penicillium</i> sp. (subgenus <i>Penicillium</i> 4)					+				-
<i>Radulidium subulatum</i>		+							P
<i>Rhizomucor pusillus</i>			+		+				E
<i>Rhizopus oryzae</i>					+				S
<i>Rhizopus stolonifer</i>	+								S
<i>Tolypocladium inflatum</i>			+		+				I
<i>Trichoderma hamatum</i> group					+				S
<i>Trichoderma koningii</i> group	+								S
<i>Trichoderma</i> sp.			+						-
Micelio blanco estéril	+			+					-
Micelio oscuro estéril	+		+						-
Número total de taxones aislados	46	13	17	11	3	13	7	2	1

*Origen del aislamiento: 1 Suelo exterior, antes de la entrada en la cueva. 2 Sedimento de la cueva, 3 Excrementos de roedores, 4 Agua de infiltración, 5 Colonias fúngicas visibles en los sedimentos de la cueva, 6 Pelos de animales, 7 Huesos de animales, 8 Restos de una vela de cera, 9 Nicho más frecuente de la especie: A aire, E excrementos de animales, H potencialmente patógeno humano, I patógeno de insectos, P plantas y/o restos vegetales en descomposición, S suelo agrícola o forestal

Tabla 1. Hongos identificados en la Cueva de Doña Trinidad (campaña de 3 de noviembre de 2008)

tes) derivada de la abundancia de excrementos que se encontraron diseminados por toda la cueva, ricos particularmente en carbono orgánico y nitrógeno. De hecho, los excrementos son evidentes a partir de la escalera de bajada, alcanzando en la Gran Sala su máxima concentración, y llegando hasta la Galería del Calvario y el Camarín.

Salvo los excrementos recientes y frescos, el resto se encuentra abundantemente colonizados por hongos, ascomicetos (Fig. 1, A-C) y basidiomicetos (Fig. 1, F), y por colémbolos, insectos que se alimentan tanto de hongos como de los propios excrementos, y dispersan las esporas fúngicas por la cueva (Fig. 1, D), circunstancia que ya se puso de manifiesto en la cueva de Lascaux (Bastian *et al.*, 2010).

En algunos casos se han encontrado una densidad de hasta 20 excrementos de roedores por m² en una zona determinada de la Gran Sala, que controlamos en ambos meses. De estos, 8 eran frescos, aún sin colonización fúngica evidente y el resto colonizados por *Mucor* spp., *Beauveria felina* y basidiomicetos (setas), pendientes de identificar. En la Fig. 1 A, B, E, se muestran excrementos de roedores colonizados por *Beauveria felina*, hongo que ya se identificó en el muestreo de 2008. Este, junto a algunas especies de *Mucor* son, actualmente, los más visibles y abundantes en la cueva. En los 17 meses transcurridos, desde el muestreo preliminar, hay que destacar el marcado aumento en el número de excrementos encontrados, lo que nos lleva a considerar como un problema de primer orden el intentar conseguir la total erradicación o una disminución del número de roedores y de su impacto sobre la cueva.

Comentarios finales

Los excrementos son reservorios de hongos e indicadores de una potencial colonización de otros substratos, en el caso de que estos sean introducidos en la cueva, o se produzca un mayor aporte de materia orgánica. En una primera exploración de las comunidades biológicas presentes en la cueva de Doña Trinidad se ha revelado que las relaciones tróficas excrementos de roedores-hongos-colémbolos son de gran importancia y representan las dianas donde un programa de conservación de la cueva debería incidir, debido a la capacidad de los excrementos de albergar comunidades fúngicas a partir de las cuales se dispersan las esporas.

Agradecimientos

Se agradece a la Consejería de Innovación, Ciencia y Empresa la financiación del proyecto RNM-5137, y a la Consejería de Cultura, Dirección General de Bienes Culturales y al personal de la Cueva de Doña Trinidad las facilidades proporcionadas para el desarrollo de este trabajo.

Referencias

Bastian, F., Alabouvette, C. and Saiz-Jimenez, C. 2009 a. Bacteria and free-living amoeba in Lascaux Cave. *Research in Microbiology*, 160 (1), 38-40.

B. Hermosín, et al., 2010. Observatorio microbiológico de cuevas: evaluación y control de comunidades fúngicas en cuevas sometidas al impacto de actividades turísticas

- Bastian, F., Alabouvette, C. and Saiz-Jimenez, C. 2009 b. Impact of biocide treatments on the bacterial communities of the Lascaux Cave. *Naturwissenschaften*, 96 (7), 863-868.
- Bastian, F., Alabouvette, C. and Saiz-Jimenez, C. 2009 c. The impact of arthropods on fungal community structure in Lascaux Cave. *Journal of Applied Microbiology*, 106 (5), 1456-1462.
- Bastian, F., Jurado, V., Novakova, A., Alabouvette, C. and Saiz-Jimenez, C. 2010. The microbiology of Lascaux Cave. *Microbiology*, 156 (3), 644-652.
- Dupont, J., Jacquet, C., Denetiere, B., Lacoste, S., Boust, F., Orial, G., Cruaud, C., Couloux, A. and Roquebert, M-F. 2007. Invasion of the French Paleolithic painted cave of Lascaux by members of the *Fusarium solani* species complex. *Mycologia* 99 (4), 526-533.
- Elliot, W.R. 2006. Biological dos and don'ts for cave restoration and conservation. In: Hildreth-Werker, V. and Werker, J.C. (eds.), *Cave Conservation and Restoration*, National Speleological Society, Huntsville, 33-46.
- Geneste, J-M. 2008. Lascaux. Conservation d'une grotte ornée. *Dossiers d'Archéologie*, 15 (1), 68-79.
- Fernández-Cortés, A., Calaforra, J.M., Martín-Rosales, W. y González-Ríos, M.J. 2008. Cavernas turísticas de Andalucía. En Calaforra Chordí, J.M. y Berrocal Pérez, J.A (eds.), *El Karst de Andalucía*. Consejería de Medio Ambiente, Sevilla, 105-115.
- Jurado, V., Sanchez-Moral S. and Saiz-Jimenez, C. 2008. Entomogenous fungi and the conservation of the cultural heritage: A review. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62 (4), 325-330.
- Jurado, V., Fernández-Cortés, A., Cuezva, S., Laiz, L., Cañaveras, J.C., Sanchez-Moral, S. and Saiz-Jimenez, C. 2009. The fungal colonization of rock art caves. *Naturwissenschaften*, 96 (9), 1027-1034.
- Jurado, V., Porca, E y Saiz-Jimenez, C. 2010. Control de un brote fúngico en la Cueva de Castañar de Ibor. *En este volumen*.
- Nováková A. 2009. Microscopic fungi isolated from the Domica Cave system (Slovak Karst National Park, Slovakia). A review. *International Journal of Speleology*, 38 (1), 71-82.
- Sire, M-A. 2008. Lascaux. A la recherche d'une nouvelle stratégie de conservation préventive. *Dossiers d'Archéologie*, 15 (1), 54-63.
- Stomeo, F., Portillo, M.C., Gonzalez, J.M., Laiz, L. and Saiz-Jimenez, C. 2008. *Pseudonocardia* in white colonizations in two caves with Paleolithic paintings. *International Biodeterioration and Biodegradation*, 62 (4), 483-486.